

ULTRAHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG
ÜBER DIE VERMEHRUNG DES MUCOSAL
DISEASE - VIRUSDIARRHOE -(MD- VD-)
VIRUS IN KULTURZELLEN

Charlotte Niess

1974
—





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr
Angefertigt in der Abteilung für Virologie unter
Leitung von Prof. Dr. H. Mahnel

ULTRAHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG ÜBER DIE VERMEHRUNG DES
MUCOSAL DISEASE-VIRUSDIARRHOE- (MD-VD-) VIRUS IN
KULTURZELLEN



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians
Universität München

von
Charlotte Niess
aus
München
München 1973

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen

Fakultät der Universität München



Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. H. Mahnel

Korreferent: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Tag der Promotion: 22. Februar 1974

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	3
2.1. <u>Einteilung und Vermehrung der Togaviren</u>	3
2.1.1. Allgemeines	3
2.1.2. Züchtung in Zellkulturen	4
2.1.2.1. Alpha- und Flaviviren	4
2.1.2.2. Nichtarbo-Togaviren	5
2.2. <u>Virusvermehrung in der Kulturzelle</u>	11
2.2.1. Allgemeines	11
2.2.2. Ultrahistologische Befunde über die Vermehrung der Alpha- und Flaviviren	12
2.2.3. Ultrahistologische Befunde über die Vermehrung der Nichtarbo-Togaviren	17
2.2.3.1. MD-VD-Virus	17
2.2.3.2. HC-Virus	18
2.2.3.3. Rubella-Virus	20
2.2.3.4. EA-Virus	22
2.2.3.5. LDH-Virus	22
2.4. Zusammenfassung	24
3. MATERIAL und METHODEN	26
3.1. Virusstämme	26
3.2. Zellkulturtechnik	26
3.3. Viruszüchtung	27

	Seite
3.4. Virustitrierung	28
3.5. Zellkulturinfektionen, Zellgewinnung und Einbettung	28
3.6. Ultrahistologie	30
4. VERSUCHE und ERGEBNISSE	31
5. BESPRECHUNG der ERGEBNISSE	47
6. ZUSAMMENFASSUNG	52
7. LITERATURVERZEICHNIS	54
8. LEBENSLAUF	

1. EINLEITUNG

Das Virus der Mucosal-Disease und Virusdiarrhoe des Rindes (MD-VD-Virus) gehört zur Familie der TOGAVIRIDAE. In diese Gruppe hat man die durch Insekten übertragenen Arbo-Viren der Untergruppe A und B und auch einige als Nichtarbo-Togaviren bezeichnete Erreger eingeordnet, zu denen neben dem MD-VD-Virus auch das Virus der Europäischen (Klassischen) Schweinepest (HC-Virus), das Pferdearteritis-Virus (EA-Virus), das Rubella-Virus und wahrscheinlich auch das Lactodehydrogenase-Virus der Maus (LDH-Virus) zählen (MELNICK, 1973). Die Togaviren sind die kleinsten behüllten Viren und enthalten Ribonukleinsäure. Sie zeigen einen relativ einheitlichen Aufbau, differieren aber in ihren biologischen Eigenschaften.

So unterscheiden sie sich unter anderem im Ablauf der Virusvermehrung. Ihre Reifung kann rein intraplasmatisch oder über eine Umhüllung an der Zytoplasmamembran erfolgen, Merkmale, die für die Untergruppierung der Togaviren in Genera Bedeutung haben (MELNICK, 1973). Daneben verläuft bei den Togaviren die Virusvermehrung in Zellkulturen teilweise sehr stürmisch und mit zellzerstörendem Effekt, andererseits wiederum permanent ohne nennenswerte Zellschädigung.

Beim MD-VD-Virus fehlen bis jetzt eingehende ultrahistologische Studien, die Aufschluß über seine Fertigstellung

und Freisetzung aus der Zelle geben. Das Virus ist daneben für vergleichende Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen Vermehrung und cytopathischer Wirkung ein gutes Modell, weil bei ihm für Zellkulturen cytopathogene wie auch nicht cytopathogene Stämme bekannt sind. An einem stark cytopathogenen MD-VD-Kulturvirus wurde in der vorliegenden Arbeit der Vermehrungsablauf in der Kulturzelle ultrahistologisch untersucht.

2. SCHRIFTTUM

2.2. Einteilung und Vermehrung der Togaviren

2.1.1. Allgemeines

Die Virusarten der Familie TOGAVIRIDAE enthalten RNS und stellen bei Größen im Bereich von 35 bis 70 nm die kleinsten behüllten Virusarten dar. Als RNS-Viren werden sie im Zytoplasma infizierter Zellen reproduziert. Sie sind labil gegenüber Fettlösungsmitteln und haben sehr geringe Dichten von 1,12-1,23 g/ml. Ihre Ribonukleinsäure ist einsträngig; das Molekulargewicht der Gesamtvirus-RNS beträgt 3×10^6 .

Die Aufbausymmetrie des Nukleokapsids konnte bei den Togaviren noch nicht hinreichend geklärt werden. Je intensiver man aber einzelne Arten analysierte, desto häufiger erhielt man Hinweise für eine kubische Struktur (CASALS, 1966), sowohl in ultrahistologischen (ABDELWAHAB und Mitarb., 1964; BLINZINGER, 1972), als auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen an negativ kontrastierten Togaviruspartikeln (SIMPSON und HAUSER, 1968; HORZINEK und MUSSGAY, 1969 und 1971). Helikale Strukturen hat man bisher nur in Präparaten von zerstörten Venezuelan Equine Encephalitis-Viren (KLIMENKO und Mitarb., 1965) und beim Virus der Europäischen Schweinepest beschrieben (MAYR und Mitarb., 1968). Das Nukleokapsid der Togaviren wird von einer vermutlich strukturierten Lipo-

proteinhülle umgeben.

In die morphologisch sowie chemisch-physikalisch definierte Familie TOGAVIRIDAE wurden als Genera die biologisch übertragenen Arbo-Viren der Untergruppe A unter dem Genusnamen ALPHAVIRUS und die Arbo-Viren der Untergruppe B unter dem Genusnamen FLAVIVIRUS eingeordnet. Die Gruppierung in Alpha- und Flaviviren erfolgt serologisch und biologisch. Den Togaviren zugerechnet werden auch fünf Virusarten, die nicht biologisch durch Arthropoden übertragen werden und die man vorläufig als NICHT-ARBO-TOGAVIREN bezeichnet. Es sind dies das MD-VD-Virus, das Virus der Europäischen (Klassischen) Schweinepest (HC-Virus), das Virus der Equinen Arteritis (EA-Virus), das Rubella-Virus und das Lactodehydrogenase-Virus der Maus (LDH-Virus) (HORZINEK, 1973). Nur zwischen MD-VD- und HC-Virus wurden gewisse serologisch-immunologische Beziehungen erfaßt. Wahrscheinlich besitzen sie ein gemeinsames "lösliches" Antigen (Lit. bei MAHNEL und MAYR, 1973). Beziehungen weiterer Art sind zwischen den Nicht-arbo-Togaviren bisher nicht bekannt geworden.

2.1.2. Züchtung in Zellkulturen

2.1.2.1. Alpha- und Flaviviren

Die ARBOVIREN lassen sich in bestimmten primären Zellkulturen, z.B. aus Hamsternieren oder Hühnerembryonen, gut züchten. Geeignet sind auch Zelllinien, wie Vero- (Affennieren), BHK-21- (embryonale Hamsternieren) oder

PK- (Schweinenieren) Kulturen (FENNER und WHITE, 1968). Ihre Vermehrung ist aber nicht immer und nicht in jeder Zellart mit einem cytopathischen Effekt verbunden (MUSSGAY, 1964). LEVKOVICH und ZASUKHIMA (1959) beschrieben einen Zeckenencephalitis Stamm, der sich auf 12 verschiedenen Zellkulturarten züchten ließ, aber nur in drei Systemen gleichzeitig einen cytopathischen Effekt hervorrief (OKER-BLOM, 1956). BANG und Mitarb. (1957) beobachteten andererseits, daß Kulturen nach einer Beimpfung mit Eastern Equine Encephalitis-Virus zwar weitgehend zerstört wurden, aus überlebenden Zellen jedoch innerhalb von 14 Tagen neue Zellen auswuchsen. Das Virus persistierte fortan in den Kulturzellen bei schwacher Vermehrung. Auch CHAMBERS (1957), DOHERTY (1958) sowie BEASLEY und Mitarb. (1960) wiesen persistierende Zellinfektionen bei Arbo-Viren nach.

Alpha- und Flaviviren lassen sich demnach gut in Zellkulturen züchten, ihre Vermehrung ist jedoch nicht in allen Zellkulturarten mit einem cytopathischen Effekt verbunden. Alle Virusstämme scheinen aber für bestimmte geeignete Kulturen cytopathogen zu sein (Lit. bei MUSSGAY, 1964).

2.1.2.2. Nichtarbo-Togaviren

Bei den sogenannten NICHTARBO-TOGAVIREN liegen die Verhältnisse anders. Das MD-VD.Virus umfaßt sowohl cytopathogene (z.B. Oregon C 24V, NADL), wie auch nicht cytopathogene

Stämme (NY 1, IND-48, SAN 78). Zur Züchtung verwendet man primäre und sekundäre Nieren- und Hodenzellkulturen von Rinderfeten und Kälbern. Nach einer Adaptierung gelang die Virusvermehrung auch in primären Schweinenierenkulturen und in Kulturen des Zellstammes PK 15 (MALMQUIST und Mitarb., 1965; FERNELIUS und Mitarb., 1969). In infizierten Zellkulturen steigt der Gehalt an MD-VD-Virus in der Regel ab der 8. bis 12. Stunde post infectionem (p.inf.) steil an. Das extrazelluläre Virus erreicht seine maximale Konzentration im Kulturmedium nach 72 bis 96 Stunden (GÜNERI, 1968; PARKS und Mitarb., 1972), um dann rasch wieder abzufallen. Der Virustiter im Kulturmedium liegt dabei stets unter dem des intrazellulären Virus (CASTRUCCI und Mitarb., 1968; GÜNERI, 1968; PARKS und Mitarb., 1972). Bei cytopathogenen MD-VD-Virusstämmen entwickelt sich der zellzerstörende Effekt nicht parallel zum ansteigenden Virusgehalt (CASTRUCCI und Mitarb., 1968). In primären Zellkulturen lassen sich frühestens ab dem 2. Tag p.inf. erste Effekte in Form von winzigen granulären Infiltrationen der Zellen erkennen. Bis zum 5. Tag lösen sich die meisten Zellen von der Glaswand ab. Cytopathisch veränderte, gefärbte Zellkulturen zeigen eine Verlängerung der Zelle, Vakuolisierung des Zytoplasmas und Kernveränderungen, wie Schrumpfung der Kernmembran, Pyknose und Karyorrhexis (HANSEN und Mitarb., 1962; WIZIGMANN und WEISS, 1967; CASTRUCCI und Mitarb., 1968; GÜNERI, 1968; HOLLING, 1971). FERNELIUS (1969) wies in Untersuchungen mit Hilfe der Immunofluoreszenz MD-VD-Virusantigen zuerst im Kern der

Wirtszelle nach. Anschließend trat es im perinukleären Raum sowie im Golgiapparat, später diffus über die Zelle verteilt auf.

Das HC-Virus vermehrt sich am besten in Kulturen aus Ferkelnieren-, Ferkelhoden- und verschiedenen embryonalen Schweinezellen. Daneben sind zahlreiche Zelllinien aus Schweinegeweben zur Züchtung gut geeignet (Lit. bei MAHNEL und MAYR, 1973). Mit Ausnahme des besonders charakterisierten Kulturvirusstammes PAV I (GILLESPIE und Mitarb., 1960) muß man alle HC-Virusstämme als nicht cytopathogen deklarieren, obwohl sich das HC-Virus in Kulturzellen relativ stark vermehrt. Die Intensität ist von der Virulenz des jeweiligen Stammes abhängig. Virulente Stämme lassen sich am besten bei einer Temperatur von 39° züchten, während für schwach und nicht virulente Stämme eine Temperatur von 37° optimal ist. Nach einer Latenzzeit von 5 Stunden vermehrt sich das HC-Virus in infizierten Zellkulturen exponentiell bis etwa zur 15. Stunde; hier ist eine Verflachung der Vermehrungskurve zu beobachten, die dann aber bis zur 50. Stunde weiter ansteigt. Titer von 10^7 und 10^8 PBE/ml können erreicht werden (MAHNEL und MAYR, 1973). Im Verlaufe der exponentiellen und anschließend persistierenden Vermehrung des HC-Virus werden die Kulturzellen offensichtlich nicht geschädigt. Auch permanent infizierte Zellen zeigen während der Virusreproduktion keine erkennbaren Störungen. Trotz einer laufenden Virussyntese und Virusausschleußung scheint ein gewisses Gleichgewicht zwischen Virus und

Kulturzelle im Anschluß an die primäre Virusvermehrung
inzutreten (MAHNEL und MAYR, 1973).

Das Rubella-Virus läßt sich sowohl in primären Zell-
kulturen (Affennieren-, menschliche Amnionzellen), als
auch in bestimmten Zelllinien (z.B. BHK-21) züchten. Wie
die meisten Arbo-Viren verursacht es aber nicht in
allen Zellarten einen cytopathischen Effekt. In Kulturen
embryonaler Zellen, wie auch in BHK-21- und primären
menschlichen Amnion- sowie Schilddrüsenzellen, wird ein
deutlicher cytopathischer Effekt ausgebildet. Zellkulturen
aus Kaninchengewebe dagegen können durch Rubella-Virus
infiziert und dabei nicht cytopathisch verändert sein.
Nach Beimpfung empfänglicher Zellen mit hohen Dosen
Rubella-Virus tritt ein Effekt nach 24 bis 32 Stunden ein,
wobei nie die ganze Zellkultur zerstört wird. Meist ent-
steht eine permanent infizierte Zellkultur bzw. Zelllinie.
Selbst wenn 80% der Kultur cytopathisch degeneriert sind
läßt sich die Kultur bei sofortigem Mediumwechsel erhal-
ten. Infizierte Kulturen wachsen dabei etwas langsamer
als nicht infizierte. Die Tendenz, persistierende Infek-
tionen in Zellkulturen auszulösen, ist nach NORRBY (1969)
für das Rubella-Virus charakteristisch. Dabei scheint un-
wesentlich zu sein, ob es dabei auch einen cytopathischen
Effekt verursacht. In BHK-21-Zellen wurden Virustiter bis
 10^7 KID₅₀/ml erreicht. Die Reproduktion und Ausschleusung
des Virus aus der Zelle verläuft hier relativ schnell.
Der Höhepunkt der Virusvermehrung wurde nach 48 bis 72
Stunden gemessen (VAHERI und Mitarb., 1965; MAES und Mit-

arb., 1966). Während der ersten Phase der Virusvermehrung bleibt der Hauptteil des neugebildeten Virus zellgebunden. Später verändert sich das Verhältnis zwischen intra- und extrazellulärem Virus, abhängig vom verwendeten Zellsystem (NORRBY, 1969).

Das EA-Virus vermehrt sich sehr gut in primären Pferdenieren-Kulturen. Es erzeugt hier einen deutlichen cytopathischen Effekt (MC COLLUM und Mitarb., 1961; BÜRKI, 1966; MAESS und Mitarb., 1970). BÜRKI (1966) erzielte mit dem Bucyrus Stamm, allerdings nach langer Adaptierung, auch in Hamster- und Kaninchen-Nierenzellen einen zellzerstörenden Effekt. Er bildet sich nach 36 bis 72 Stunden aus (MAESS und Mitarb., 1970). Die Virussynthese beginnt beim EA-Virus zwischen der 6. bis 12. Stunde p. inf.; nach 12 bis 18 Stunden setzt die Virusausschleusung ein. Die höchsten Virustiter in der Kultur wurden nach 30 bis 40 Stunden nachgewiesen (MAESS und Mitarb., 1970).

Das LDH-Virus läßt sich nur in primären Zellkulturen (YAFFE, 1962) züchten und vermehrt sich ohne cytopathischen Effekt in Zellen aus Mäuseembryonen, embryonalen Lebern und Nieren oder peritonealen Makrophagen von Mäusen (PLAGEMANN und SWIM, 1963; EVANS, 1964; DU BUY und JOHNSON, 1966). Nach 48 Stunden p. inf. wurde in Zellkulturen von peritonealen Makrophagen ein Virustiter von 10^7 erreicht (DU BUY und JOHNSON, 1966).

Tabelle 1: Überblick über die Züchtung der Togaviren in Zellkulturen

Virusart	optimale Zellsysteme	Vermehrungsintensität	Infektionsablauf und Cytopathogenität
MD-VD-Virus	homologe Zellarten und Zelllinien	mäßig bis gut, stammabhängig	cytopathogene und nicht cytopathogene Stämme; bei letzteren permanente Infektionen
HC-Virus	homologe Zellarten und Zelllinien	mäßig bis gut, abhängig von Stammvirulenz und Temperatur	alle Stämme in der Regel nicht cytopathogen; permanente Infektionen
EA-Virus	homologe Zellarten und Zelllinien	gut	cytopathogen
Rubella-Virus	homologe Zellarten und Zelllinien; gewisse heterologe Zellarten von Nagern	gut	nicht für alle Zellarten und nicht vollständig cytopathogen; permanente Infektionen
LDH-Virus	homologe primäre Zellkulturen	gut	nicht cytopathogen
Alphaviren	breites Zellspektrum	gut bis sehr gut	alle Stämme cytopathogen, aber nur für bestimmte Zellarten; in nicht cytopathischen Systemen permanente Infektionen
Flaviviren	breites Zellspektrum	gut bis sehr gut	alle Stämme cytopathogen, aber nur für bestimmte Zellarten; in nicht cytopathischen Systemen permanente Infektionen

2.2.1. Allgemeines

Für die Unterteilung der in der Virusmorphologie relativ einheitlichen Togaviren in Genera bzw. Untergruppen bildet neben den biologischen Eigenschaften und den serologischen Beziehungen der Ablauf der Virusvermehrung in der Zelle, insbesondere der Ort und Mechanismus der Kapsidumhüllung sowie die Ausschleusung der fertigen Viruspartikel, ein wesentliches Kriterium (MELNICK, 1973).

Bei den Virusarten des Genus ALPHAVIRUS kann die Umhüllung der Nukleokapside offenbar sowohl an der Oberflächenmembran der Zelle im Zuge der gleichlaufenden Partikelreifung und -ausschleusung, als auch an intraplasmatischen Membranstrukturen stattfinden. Beide Wege wurden beim Semliki Forest-Virus in Hühnerembryo-Zellkulturen (ACHESON und TAMM, 1967) und an Gehirnzellen infizierter Mäuse (GRIMLEY und FRIEDMAN, 1970), wie auch an Alphavirus Sindbis in Hühnerembryozellkulturen nachgewiesen (GIL-FERNANDEZ und Mitarb., 1973). Beim Chikungunya-Virus hat man einerseits die Reifung und Umhüllung des Viruspartikels in Vero-Zellen an Membranen von Zytoplasmavakuolen (HIGASHI und Mitarb., 1967), andererseits in Hühnerembryo-Zellkulturen an Pseudopodien der Zellmembran beschrieben (CHAIN und Mitarb., 1966).

Die FLAVIVIREN dagegen werden nach den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen ausschließlich an intra-

plasmatischen Membranen umhüllt. Die reifen Viruspartikel gelangen dann entweder nach der Cytolysis oder, bei noch intakten Zellen, über eine Abstoßung virushaltiger Zytoplasmateile aus der Zelle (Lit. vergl. 2.2.2.).

Diese Unterschiede in der Vermehrung der Arbo-Viren wurden inzwischen als Klassifizierungsmerkmale für Alphaviren und Flaviviren benannt (MELNICK, 1973).

Für die NICHTARBO-TOGAVIREN liegen dem "International Committee on Nomenclature of Viruses" noch keine diesbezüglichen Empfehlungen vor. Die Reifung und Umhüllung scheint beim HC-, EA- und LDH-Virus innerhalb des Zytoplasmas stattzufinden. Nur beim Rubella-Virus hat man zum Teil auch eine Umhüllung von Nukleokapsiden mit der Partikel ausschleusung über die Zellmembran beobachtet.

2.2.2. Ultrahistologische Befunde über die Vermehrung der Alpha- und Flaviviren (Arbo-Viren)

ACHESON und TAMM (1967) untersuchten die Vermehrung des Alphavirus Semliki Forest in Hühnerembryo-Zellkulturen ultrahistologisch. Bereits 4 Stunden p. inf., während der Phase der stärksten Virusvermehrung, ließen sich freie Viruskapside in der Zytoplasmamatrix nachweisen, die, nach Meinung der Autoren, anschließend einzeln zur Plasmamembran wandern dürften, wo sie durch den in der anglo-amerikanischen Literatur so benannten "Budding"-Prozess - Umhüllung eines Nukleoids bzw. Nukleo-

kapsids an einer Membranstruktur - umhüllt und aus der Zelle ausgeschleust wurden. Nach 9 Stunden war die Virusvermehrung bereits weitgehend abgeschlossen, denn es wurden dann nur noch reife Viruspartikel beobachtet. Während dieser Zeitspanne entstanden in den infizierten Zellkulturen umschriebene zytopathische Veränderungen, vornehmlich eine Vakuolisierung des Zytoplasmas. Die Reifung des gleichen Virus in HEP-2-Zellen wurde von ERLANDSON und Mitarb. (1967) recht genau untersucht. Die Autoren beobachteten im perinukleären Zytoplasma tubuläre, von Membranen umhüllte Strukturen mit einem Durchmesser von 30 bis 40 nm. Zum Teil waren diese Strukturen von einigen 25 nm großen elektronendichten Partikeln umgeben. In der Zeit zwischen 24 und 42 Stunden p. inf. ließen sich dann auch 42 bis 50 nm große Partikel nachweisen. Die Zellen enthielten zu diesem Zeitpunkt Formen aller Virusvermehrungsstadien. Die Mitochondrien verformten sich und Lipidtröpfchen traten auf. Ab der 24. Stunde wurde fertiges Virus auch extrazellulär beobachtet. Die Autoren machten keine Angaben über die Art der Virusausschleusung. In mit Semliki Forest-Virus infizierten Mäusegehirnen konnten GRIMLEY und FRIEDMAN (1970) zwei unterschiedliche Wege der Virusreifung ultrahistologisch nachweisen: 1. Budding von 28 bis 30 nm großen Virusnukleokapsiden durch die Zytoplasmamembran, wobei eine Verdickung der über dem Nukleokapsid liegenden und die Virushülle bildenden Zellmembran eintrat, und 2. Budding von Nukleokapsiden in intraplasmatisch liegende Kanäle. Einige dieser Kanäle stammten

offenbar von Zisternen des Golgiapparates ab,während andere aus Lamellen des endoplasmatischen Retikulums, das anscheinend sein Ribosomenkomplement verloren hatte, entstanden sein dürften.GRIMLEY und FRIEDMAN (1970) beschrieben ferner bei infizierten Zellen 2 verschiedene Typen von Zytoplasmavakuolen (CPV),die CPV I,die aus vielen Membranvesikeln bestanden und dann auftraten,wenn CPV II und Virusnukleokapsidanhäufungen nicht zu beobachten waren,und die CPV II,die später auftraten,größer waren und z.T.Virusnukleokapside enthielten.

ALPHAVIRUS SINDBIS soll nach GIL-FERNANDEZ und Mitarb. (1973) in Hühnerembryofibroblasten-Kulturen ebenfalls in 2 unterschiedlichen Prozessen reifen können.Einmal wurden Partikel 4 bis 6 Stunden p.inf.über ein Budding an der Zytoplasmamembran fertiggestellt und ausgeschleust. Die Zelle war dabei stark durch Vakuolisation des Zytoplasmas verändert.In einigen Vakuolen befanden sich Vesikel,die an der inneren Membranfläche der Vakuolen lagen. Ähnliche Vesikel waren auch in der Nähe von kompletten Viruspartikeln lokalisiert und ähnelten Virushüllen,die keine Nukleokapside enthielten.Dichte Lipidtröpfchen fanden sich verstreut in der Zelle.Ein zweiter Weg der Virusreifung liess sich 10 Stunden p.inf.beobachten.Die Nukleokapside waren zunächst überwiegend ringförmig außen um Vakuolarmembranen gelagert.Darauf folgte ihre Umhüllung (Budding) durch Invagination in die Lumina der Vakuolen,in denen sich dann reife Viruspartikel sammelten.

Beim Chihungunya-Virus haben HIGASHI und Mitarb.(1967) in Vero-Zellen den gleichen Gang der Partikelumhüllung an Vakuolarmembranen beobachten können.Dagegen stellten CHAIN und Mitarb.(1966) nur eine Umhüllung und Ausschleusung des Virus über die Zellmembran fest.Die ersten Viruspartikel traten bereits 8 Stunden p.inf.an der Zelloberfläche über Pseudopodien aus der Zelle aus.Die Autoren konnten keine Reifung an Vakuolen im Zytoplasma beobachten.

Die Nukleokapside von FLAVIVIREN wurden bei allen bisher untersuchten Virus-Zellsystemen in Zisternen und Vakuolen des endoplasmatischen Retikulums und in membranbegrenzten Räumen des Golgiapparates gebildet,ähnlich also,wie die der Alphaviren.Die Umhüllung erfolgte aber ausschließlich durch intraplasmatische Membranstrukturen (OTA,1965;YASUZUMI und TSUBO,1965;FILSHIE und REHACEK, 1968;MURPHY und Mitarb.,1968;OYANGI und Mitarb.,1969; DAVID-WEST und Mitarb.,1972).

Ein exaktes Bild über die Veränderungen an HeLa-Zellen vermittelten die Untersuchungen von KOVAC und Mitarb. (1961) über die Vermehrung der Frühsommer-Meningoencephalitis-Virus.Bei den cytopathisch veränderten HeLa-Zellen war der Golgiapparat vergrößert und enthielt vermehrt Lamellen.0,7 nm dicke Fibrillen traten zu Bündeln geordnet im Bereich um den Golgiapparat auf.Die neugebildeten,fertigen "Viruselementarkörperchen" lagen zunächst in kleinen Gruppen ausschließlich in einer intraplasma-

tischen Verdichtungszone. Sie waren in Reihen angeordnet, später aber über das ganze Zellplasma disseminiert und selten an lamellären Strukturen lokalisiert. Innerhalb der Verdichtungszone traten sackartige Gebilde und Schläuche auf, deren Wände aus Doppellamellen zu bestehen schienen. Zu Beginn der Infektion waren die Mitochondrien nicht verändert, später jedoch tubulär verformt. Erst in den letzten Stadien der Virusvermehrung vergrößerten sich die Mitochondrien und ließen eine zentrale Aufhellung erkennen. Im Kern infizierter Zellen war die Nukleolarsubstanz vermehrt. Parallel zur Virusvermehrung traten dann Degenerationserscheinungen und eine Verdichtung des Kernchromatins an der Kernmembran auf. Schließlich degenerierte das Zytoplasma vakuolär, die Zelle zerfiel und ließ die Viren austreten.

Auch MURPHY und Mitarb. (1968) beschrieben bei ZNS-Zellen einer mit St. Louis-Encephalitis-Virus infizierten Maus eine Hypertrophie der Zytoplasmaorganellen im endoplasmatischen Retikulum und Golgiapparat. Die fertigen Viruspartikel wurden hier anscheinend durch Zerstörung der Zellmembran frei. Dicht mit reifen, bereits umhüllten Japanese-B-Encephalitis-Viren bepakte Zytoplasmavakuolen in Schweinenieren-Kulturzellen wanderten nach OTA (1965) zur Zelloberfläche und wurden dort in einem Prozess, der einer umgekehrten Phagozytose ähnelt, aus der Zelle ausgeschleust, ohne daß die Zellmembran zerstört wurde. BLINZINGER und Mitarb. (1971) beobachteten in Neuronen einer Maus, die mit einem dem Zeckenencephalitis-Komplex

angehörenden Arbo-Virus der Gruppe B infiziert war, ausgeprägte Chromatolyse; darüberhinaus befanden sich in manchen Kanälen des endoplasmatischen Retikulums unmittelbar neben neu gebildeten reifen Virionen tubuläre Gebilde, die bei höherer Auflösung doppelsträngigen Helices ähnelten. Es gelang den Autoren nicht, die Natur dieser Microhelices zu klären. BLINZINGER und Mitarb. (1973) folgerten aufgrund anderer Studien, daß dieses Virus aus BHK-21-Zellen durch Zytolyse frei wird. Extrazelluläres Virus trat in der Nähe einzelner zusammenhangsloser Zellen auf.

2.2.3. Ultrahistologische Befunde über die Vermehrung der Nichtarbo-Togaviren

2.2.3.1. MD-VD-Virus

Ultrahistologische Untersuchungen, deren Ergebnisse Schlüsse auf die Art der Reifung, Umhüllung und Ausschleusung des Virus in Kulturzellen zulassen, fehlen bisher. Aus Studien mittels der Immunofluoreszenz weiß man lediglich, daß das MD-VD-Virus im Zytoplasma der Zelle synthetisiert wird und vermutet eine über den Golgiapparat anlaufende Virus-synthese (FERNELIUS, 1969). In infizierten Zellkulturen wurde in der Endphase ein hoher Gehalt an extrazellulärem MD-VD-Virus bei geringem intrazellulärem Virusanteil gemessen, nachdem der extrazelluläre Virustiter nur langsam anstieg, dann aber längere Zeit auf gleicher Höhe blieb. PARKS und Mitarb. (1972) nahmen deshalb an, daß das Virus

über einen Budding-Prozess oder durch Zerstörung von Zytoplasmavakuolen aus der infizierten Zelle frei wird. Von PETER und Mitarb.(1968) wurden cytopathisch veränderte Kulturen aus lymphatischem Kälbergewebe auch ultrahistologisch untersucht. Auffallend war eine starke zytoplasmatische Vakuolisierung der Zellen. Diese 300-1600 nm großen Vakuolen enthielten laminäre Strukturen. Im Zytoplasma traten ferner 100 bis 120 nm große Partikel mit Projektionen auf. Einige dieser Partikel mit elektronendichtem Zentrum lagen an der Zytoplasmamembran. An Kernveränderungen wurden Pyknose und Vermehrung des Chromatins besonders an der Kernmembran beobachtet. PETER und Mitarb. hielten die von ihnen festgestellten Zellveränderungen in lymphatischem Gewebe nicht für virusspezifisch.

Partikel von 30 bis 50 nm und von 15 bis 20 nm Durchmesser wurden von RITCHIE und FERNELIUS (1960) in infizierten EKN-Zellen ultrahistologisch nachgewiesen. Die Autoren berichten daneben nur von unstrukturierten "membrangebundenen" sowie von uniformen nicht membrangebundenen unbehüllten Partikeln.

2.2.3.2. HC-Virus

Einen umfangreichen Überblick über die Vermehrung des HC-Virus in Monolayer-Kulturen von PK 15-Zellen, in denen kein cytopathischer Effekt auftritt, vermittelten die ultrahistologischen Untersuchungen von SCHERRER und Mit-

arb.(1970).Vor der 10.Stunde p.inf.war in infizierten Zellen kaum neugebildetes Virus zu beobachten.Partikel mit deutlicher Virusstruktur traten erst nach etwa 15 Stunden auf.Nur in 15% der Zellen ließ sich Virus in geringer Zahl darstellen.Die Reifung und Umhüllung vollzog sich im Bereich des Golgiapparates,an intraplasmatischen Membranen und an verschiedenen Zytoplasmavakuolen.Nach SCHERRER und Mitarb.findet die Synthese der Virusvorstufen vermutlich im perinukleären Raum der Zellen statt, worauf auch fluoreszenzserologische Befunde an infizierten Kulturzellen hinwiesen.Die meisten reifen Viruspartikel wurden später in Zonen von diffusen plasmatischen Material beobachtet,in unmittelbarer Nachbarschaft der Zellmembran oder eng an ihr liegend.Die Autoren rechneten diese Zonen dem extrazellulären Bereich zu,während sie nach Beobachtungen von MAHNEL (zit.nach MAHNEL und MAYR, 1973) intrazellulär verbleiben dürften.

Reife Viruspartikel sammelten sich in mäßiger Anzahl auch in Plasmavakuolen und in Zwischenzellräumen.Z.T. fand sich Virus auch an Fortsätzen der Zytoplasmamembranen.

SCHULZE (1966) untersuchte ultrahistologisch Lymphknoten von infizierten Schweinen und beobachtete Partikel von 22-25 nm Größe in kristalloider Anordnung oder locker zu Ketten aufgereiht im Zytoplasma.Das Gesamtbild ließ nach SCHULZE eine Beziehung zwischen diesen Partikeln und einer Virusbildung an Membranen des endoplasmatischen

Retikulums vermuten, denn virusähnliche Partikel von 40 nm Größe konnten auch in Zytoplasmavakuolen nachgewiesen werden.

2.2.3.3. Rubella-Virus

Die Vermehrung von Rubella-Virus in BHK-21-Kulturzellen untersuchten VON BONSDORFF und VAHERI (1969). In der Regel lagerten sich intraplasmatisch neugebildete Viruskapside zunächst ringförmig um die Bläschen und Vakuolen des Golgiapparates, drangen durch Budding in diese ein und sammelten sich als reife umhüllte Partikel an. Die Degeneration der Zellen begann nach 25 Stunden. Der Golgiapparat vergrößerte und verformte sich zu großen Vakuolen, die überwiegend amorphes (Virus-) Material enthielten. Neben dieser Form der Virusreifung konnten VON BONSDORFF und VAHERI vereinzelt aber auch eine Nukleokapsidbildung und Umhüllung unmittelbar an der Zellmembran beobachten. Im Zytoplasma ließ sich dann keine Anhäufung von Nukleokapsiden feststellen. Sie traten immer nur unmittelbar am Orte der Umhüllung auf. EDWARDS und Mitarb. (1969) bestätigten anhand eigener Untersuchungen die Befunde von BONSDORFF und VAHERI, und wiesen ergänzend auf eine Vakuolisierung des Golgiapparates und des endoplasmatischen Retikulums hin, die dem Virusbudding vorausgehen. Nach EDWARDS und Mitarb. entwickelten sich nach der Virusreifung große vakuoläre Komplexe, die zahlreiche Viruspartikel enthielten. Die fertigen Viruspartikel wurden durch Zellzerstörung aus der Zelle frei.

Zwei Möglichkeiten der Virusreifung beschrieben auch MURPHY und Mitarb.(1968). Sie beobachteten die Virusreifung mit Umhüllung an der Zellmembran häufiger, als an intraplasmatischen Membranen.

In infizierten Organkulturen fanden KLISTER und Mitarb. (1967) auch Myelinspiralen und in Abbau begriffene Zellorganellen. An Kulturen nicht cytopathisch veränderter Affennierenzellen traten nach KIM und BOATMAN (1967) auch ringförmige Lamellen im Zytoplasma auf. In Verbindung dazu standen z.T. kristalline Strukturen. Der Zellkern infizierter Zellen wies keine Veränderungen auf.

HOLMES und Mitarb.(1968) infizierten RK-13-Zellen mit dem Rubella Stamm RCH 657 und BHK-21-Zellen mit dem Stamm Baylor R 1, ernteten die Kulturen zum Zeitpunkt des stärksten cytopathischen Effektes und untersuchten sie ultrahistologisch. In den RK-13-Zellen fanden sie reifes Virus in Vesikeln, die meist in der Gegend des Golgiapparates lagen. Zwei von hundert RK-13-Zellen enthielten daneben im Zytoplasma kristalline Partikel von 19 nm Durchmesser. In BHK-21-Kulturzellen beobachteten die Autoren auch unbehüllte Viruspartikel in der Nähe der Zelloberfläche. Nur wenige Zellen enthielten Bläschen und tubuläre, vom endoplasmatischen Retikulum stammende und mit Ribosomen besetzte Strukturen. In diesen Zellen traten keine Kristalle auf.

2.2.3.4. EA-Virus

Über seine Vermehrung liegen lediglich ultrahistologische Untersuchungen von MAGNUSSON und Mitarb.(1970) an BHK-21-Zellen vor. 18 Stunden p. inf. wurden einzelne Viruspartikel in Zisternen des endoplasmatischen Retikulums nahe dem Golgiapparat, nach 24 Stunden über das gesamte Zytoplasma verteilt, mit reifen Viruspartikel angefüllte Vakuolen beobachtet. Unbehüllte Nukleokapside traten im Zytoplasma nur selten und nur kurz vor dem Budding in die Vakuolen hinein auf. Nach 42 Stunden waren die meisten Kulturzellen zerstört. Reife EA-Partikel lagen dann verstreut in Zelltrümmern.

2.2.3.5. LDH-Virus

Ultrahistologisch wurden von DU BUY und JOHNSON (1966) Kulturen aus infizierten Mäuselymphknoten untersucht. LDH-Nukleokapside sammelten und häuften sich zunächst im Zytoplasma an und wurden mit dem Eintritt in Vakuolen umhüllt. In Kulturen peritonealer Makrophagen infizierter Mäuse wurden die reifen Partikel nach PROSSER und EVANS (1967) offenbar auf die gleiche Weise im endoplasmatischen Retikulum gebildet und umhüllt. Sie sammeln sich ebenfalls in Vakuolen. Die Freisetzung der neugebildeten Viren erfolgte vermutlich durch Zellysis.

Tabelle 2: Überblick über die Art der Reifung, Umhüllung und Ausschleusung von Togaviren in Kulturzellen (anhand des bisher vorliegenden Schrifttums)

ER = endoplasmatisches Retikulum; GK = Golgikomplex

Virusart	Nukleokapsidbildung	Ort und Mechanismus der Umhüllung	Austritt aus der Zelle	Bemerkungen
MD-VD-Virus	im Zytoplasma	im Zytoplasma	nicht bekannt	
HC-Virus	am GK und im ER des perinukleären Raumes	an intraplasmatischen Membranen und Vakuolen durch Budding; Ansammlung in intraplasmatischen amorphen Zonen	wahrsch. überwiegend durch Ausschleusung virushaltiger Plasmazonen ohne Lysis	
Rubella-Virus	am GK und im ER; Ansammlung um Vakuolen oder Membranelemente intraplasmatisch nahe der Zellmembran	an Vesikeln und Vakuolen durch Budding; Ansammlung in großen Vakuolen im Zuge der Ausschleusung des Virus-Partikels an und durch die Zellmembran	durch Zellysis	überwiegender Weg der Reifung seltener Weg der Reifung
EA-Virus	am GK und im ER	an Vakuolen durch Budding; Ansammlung in Zysternen und Vakuolen	durch Zellysis	
LDH-Virus	im ER	an Vakuolen durch Budding; Ansammlung in Vakuolen	durch Zellysis	
Alphaviren	in der Zytoplasma-matrix	im Zuge der Ausschleusung des Virus-partikels an und durch die Zellmembran	über Pseudopodien im Anschluß an die Umhüllung	Semliki Forest-Virus, Sindbis-Virus, Chikungunya-Virus
	Am GK und im ER des perinukleären Raumes; Ansammlung um Vakuolen und Kanäle	an intraplasmatischen Kanälen (Colgig-abhängig?) und Vakuolen durch Budding; Ansammlung in tubulären Zonen und Vakuolen	durch Zellysis; wahrsch. auch per Ausschleusung virushaltiger Vakuolen und Kanäle ohne Lysis	
Flaviviren	am GK und im ER; Ansammlung um Membranzustrukturen	an intraplasmatischen Membranen von Zisternen und Vakuolen durch Budding; Ansammlung in Viruszonen	durch Zellysis und Ausschleusung virushaltiger Plasmazonen ohne Lysis	FSME-Virus, St. Louis-Encephal.-Virus, Japan-B-Enceph.-Virus, Europ. Zeckenceph.-Virus

2.2.4. Zusammenfassung

Die Ergebnisse ultrahistologischer Untersuchungen über die Vermehrung der Togaviren in Zellkulturen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die N u k l e o k a p s i d e der Togaviren werden im Zytoplasma und überwiegend im Bereich des Golgi-komplexes und des endoplasmatischen Retikulums gebildet.
2. Die U m h ü l l u n g und R e i f u n g der Viruspartikel kann auf zwei verschiedenen Wegen geschehen. Bei allen Flaviviren und den Nichtarbo-Togaviren HC-, EA- und LDH-Virus finden diese Vorgänge ausschließlich, beim Rubella-Virus überwiegend und bei den Alphaviren teilweise über einen Budding-Prozess an intraplasmatischen Membranstrukturen statt, gefolgt von der Ansammlung kompletter Virionen in Zytoplasmaräumen. Bei den Alphaviren werden regelmäßig, beim Rubella-Virus gelegentlich Viruskapside auch an bzw. von der Zytoplasmamembran beim Austritt aus der Zelle umhüllt.
3. Die r e i f e n T o g a v i r e n werden bei Alphaviren und in geringem Umfang beim Rubella-Virus einmal über die intakte Zellmembran und Pseudopodien aus der funktionstüchtigen Zelle ausgeschleust.

Intraplasmatisch gereifte und angesammelte Viruseinheiten, wie sie bei allen Nichtarbo-Togaviren, den Flaviviren und z.T. auch den Alphaviren vorliegen, werden

bei cytopathischen Zellsystemen durch die Zelllysis freigesetzt. Daneben können sehr wahrscheinlich bei intakten Zellen Zytoplasmabezirke mit reifen, bereits umhüllten Viren auch permanent aus Zellen durch Abstoßung bzw. Ausschleusung austreten.

3. MATERIAL und METHODEN

3.1. Virusstämme

Für alle Versuche wurde der cytopathogene von DINTER und BORDEN (1964) isolierte MD-VD-Virusstamm "Dänemark" UG 59 herangezogen. Der Stamm lag als Kulturvirus aus der 19.-23. Passage in Kälberhoden-Kulturen vor. Die Lagerung des Virus erfolgte bei -70°C .

3.2. Zellkulturtechnik

Alle Zellkulturen wurden als Primärkulturen angelegt. Als Ausgangsmaterial dienten Kälberhoden oder fetale Kälbernieren.

Kälberhodenkulturen (KH)

Von Hoden gesunder Schlachtkälber wurden die Tunica vaginalis und die Epididymides abpräpariert und das Hodenparenchym aus der Tunica albuginea herausgeschält. Die Herstellung der Zellkulturen erfolgte durch wiederholte Trypsinbehandlung. Als Anzuchtmedium diente eine Lösung aus 78% Earle'scher Salzlösung, 10% foetalem Kälberserum, 10% hydrolysiertem Lactalbumin 5%ig, 2% Phenolrot 0,1%ig, 100 i.E./ml Penicillin, 100 μg /ml Streptomycin. Die in einer Konzentration von 1 Mill./ml eingesäten Hodenzellen wuchsen in den Kulturgefäßen in der Regel in drei bis vier Tagen zur dichten Einschichtkultur aus.

Embryonale Kälbernieren Kulturen (EKN)

Nieren wurden von Rinderfeten (ca 6. bis 8. Monat) entnommen und unter sterilen Bedingungen aus den Kapseln gelöst. Die Gewinnung der Kulturzellen erfolgte nach den bekannten Methoden der wiederholten Trypsinandaunung. Sie wurden dann im gleichen Anzuchtmedium wie die KH-Kulturen suspendiert, auf eine Zellzahl von 1 Mill./ml eingestellt und in Vierkantflaschen oder Rouxschalen eingesät. Ein dichter, einschichtiger Zellrasen bildete sich in der Regel nach 5 bis 7 Tagen.

3.3. Viruszüchtung

Bei dicht gewachsenen KH-Kulturen in Rouxflaschen wurden die Zellen nach Entfernen des Anzuchtmediums mit 10 ml MD-VD-Kulturvirus überschichtet. Das Mengenverhältnis zwischen kulturinfektiosen Viruseinheiten und der Kulturzellzahl lag dabei zwischen 1:2 und 1:3. Nach dreistündiger Inkubation wurde der Kultur anschließend Erhaltungsmedium (88% Earle'sche Salzlösung, 10% hydrolisiertes Lactalbumin 5 %ig, 2% Phenolrot 0,1%ig, 100 i.E. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) in der üblichen Menge zugegeben und die infizierten Kulturen weiter bebrütet. Die Ernte erfolgte am Höhepunkt der Kulturzerstörung. Die gesamte Kultur (Medium und Zellphase) wurde bei -70°C eingefroren, dann rasch aufgetaut und mit Ultraschall behandelt. Auf diese Weise hergestellte Virussuspensionen bildeten das Ausgangsmaterial für alle Versuche. Die Suspensionen wurden auf ihren Virusgehalt

geprüft und Chargen mit einem Titer von $10^7 \text{KID}_{50}/\text{ml}$ und höher in Portionen zu ca. 10ml bei -70°C bis zur Verwendung eingefroren.

3.4. Virustitrierung

Zur Titration wurden die entsprechenden Virussuspensionen in Zehnerpotenzen verdünnt und die Verdünnungsstufen auf je 4 KH-Kulturen in Reagenzgläsern verimpft. Die Auswertung erfolgte anhand des cytopathischen Effektes, die Titerberechnung nach KAERBER (1931).

3.5. Zellkulturinfektionen, Zellgewinnung und Einbettung

A. In normalen Kulturflaschen

In Rouxflaschen dichtgewachsene Kulturen von EKN- oder KH-Zellen wurden nach der unter III/3 beschriebenen Technik mit MD-VD-Virus beimpft, 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit Erhaltungsmedium beschickt. In bestimmten Abständen nach der Infektion, und zwar nach 8, 19, 34, 48 und 72 Stunden, wurden Kulturen für die ultra-histologische Untersuchung entnommen. Aus den Kulturfäßen wurden die infizierten Zellen mit Hilfe eines Gummischabers abgekratzt oder durch rasches Einfrieren (-70°C) und Auftauen abgelöst. Die Zellen wurden dann bei 1000 U/min 5 Minuten lang abzentrifugiert, die entstandenen Pellets (Sediment) mit 1,5%igem Glutaraldehyd eine Stunde lang bei 4°C fixiert, mit Natriumphosphatpuffer 0,1M, pH 7,4, gewaschen, bei 4°C in gepuffertem Osmiumtetroxid nach-

fixiert und schließlich nach nochmaligem dreifachen Waschen über Nacht mit 0,25% igem Uranylacetat kontrastiert. Daran schloß sich die Entwässerung der Zellpellets in der Alkoholreihe und schließlich in Propylenoxid an. Die Zellklümpchen wurden dann in 0,5-1 mm große Stücke zerkleinert und in Durcupan eingebettet. Die Präparatblöcke polymerisierten 48 Stunden bei 60°C und härteten mindestens 48 Stunden bei Zimmertemperatur nach.

B. Auf Plastikfolien

Im Rahmen eines speziellen Präparationsverfahrens wurden KH-Zellen auf Hostaphanfolien gezüchtet. Die Folien wurden zuvor wie folgt behandelt:

1. Intensives Abreiben der Folien mit einem in 50%igem Äthylalkohol getränkten Lappen;
2. Zuschneiden der Folien für Kunststoff-Petrischalen
3. Intensives Waschen in 50%igem Äthylalkohol,
4. Einlegen der Folien für 48 Stunden in absoluten Alkohol,
5. Die nassen Folien werden, mit sterilen Glasröhrchen beschwert, in sterile Plastikpetrischalen eingelegt und diese 30 bis 60 Min. im Brutschrank offen aufbewahrt, so daß aller Alkohol verdampft.

Die Beimpfung, Adsorption und Bebrütung der auf Folien angelegten Zellkulturen wurde wie unter 5A beschrieben vorgenommen. Während der Fixierung, Dehydrierung (es wurde nur in Alkohol entwässert) und Einbettung blieben die

Zellen auf den Folien haften. Zur Einbettung wurde Durcupan auf die in der Petrischale liegende Folie gegossen, nach dem Polimerisieren und Härten kleine runde Blöcke aus dem Durcupan gestanzt, sowie anschließend die Folie vorsichtig von der Oberfläche des Blockes abgelöst. Die Zellen verblieben dabei im Durcupan.

3.6. Ultrahistologie

Von den in Durcupanblöcke eingebetteten Präparaten infizierter und nicht infizierter (Kontrollen) Zellen wurden mit einem Ultramikrotom (LKB-Ultratom I) und Glasmessern Ultradünnschnitte angefertigt, auf Formvar-befilmte Trägernetze aufgenommen und nach REYNOLDS (1963) doppelkontrastiert. Sie wurden in einem Elektronenmikroskop, Marke Siemens Elmiskop I, bei 80.000 KV unter Feinstrahl durchgemustert und ausgewertet.

4. VERSUCHE und ERGEBNISSE

Die Versuchsanordnung mußte sich an den Ergebnissen orientieren, die aus quantitativen Untersuchungen über die Vermehrung des MD-VD-Virus in Zellkulturen vorlagen.

Nach einer Infektion von Monolayer-Kulturen aus EKN-Zellen mit cytopathogenem MD-VD-Virus konnte etwa 8 Stunden p.inf. erstmals neugebildetes Virus nachgewiesen werden. 18 bis 24 Stunden p.inf. erreichte die Vermehrung in der Zelle ihren Höhepunkt (29).

Die in den eigenen Studien ultrahistologisch zu untersuchenden Kulturzellen wurden mit einer Virusmenge beimpft, die nur der Hälfte bis einem Drittel der Zellzahl in der Kultur entsprach. Bei optimaler Verteilung des Animpfvirus auf die Zellen wurde also primär nur etwa jede 2. bis 3. Kulturzelle, die Mehrzahl der Zellen aber erst sekundär durch neu gebildetes Virus frühestens 8 Stunden später infiziert. In diesen EKN-Kulturen trat ein lichtoptisch nachweisbarer cytopathischer Effekt (cpE) erstmals nach etwa 20-30 Stunden in Form kleinblasiger Degenerationen im Zytoplasma auf. Frühestens nach 40 Stunden setzten erste Lysisprozesse ein. Der cpE breitete sich dann kontinuierlich aus und führte 3 bis 4 Tage p.inf. zur totalen Zerstörung der Zellkultur.

Diesen zeitlichen Verhältnissen und dem Beginn des cpE wurde die Entnahme der infizierten Kulturzellen zur Einbettung und ultrahistologischen Untersuchung angepaßt. Sie erfolgte zunächst nach 8, 19 und 34 Stunden, zu Zeit-

punkten also, da noch keine cytopathischen Zellveränderungen lichtoptisch erkennbar waren. Eine zweite Serie von Kulturzellen wurde 48 und 72 Stunden p.inf. in der Zeitspanne zunehmender cytopathischer Veränderungen geerntet und eingebettet.

Die ultrahistologische Untersuchung von cytopathisch veränderten Zellen ließ Bilder mit überwiegend reifen, intrazellulär angesammelten oder extrazellulär gelagerten Viruspartikeln erwarten. Die Auswertung der frühen Phasen des Virus-Zell-Systems dagegen sollte Aufschluß geben, wo Viruspartikel gebildet und wie sie umhüllt und aus der Zelle ausgeschleust werden. Einheitliche Vermehrungsstadien wurden in den Präparaten nicht erhofft, da von unterschiedlichen, nicht exakt bekannten Zeitpunkten der Zellinfektion (keine Einschnittsvermehrung) ausgegangen werden mußte.

Dementsprechend waren in den Ultradünnschnitten aus infizierten Kulturen Zellen ohne Anzeichen einer Virusvermehrung und solche in verschiedenen Phasen der Virusbildung zu finden.

Infizierte Zellen ließen zu Beginn der Virusbildung, etwa ab 8 Stunden p.inf., gegenüber normalen Kulturzellen eine erhöhte Zytoplasmaaktivität erkennen. Besonders im kernnahen Bereich und in der Nähe des Golgiapparates traten auffallend vermehrt angeschwollenes, granuläres endoplasmatisches Retikulum sowie Lysosomen-ähnliche Gebilde in Erscheinung (vergl. Abb. 1). Gleichzeitig wurde eine Zunahme

der Membranstrukturen beobachtet, die sich an einigen Stellen zu elektronendichten Bündeln, sonst aber nur im lockeren Verband lagerten (vergl. Abb. 1 und 2). Vorallem umgaben sie den Golgikomplex diffus und verzweigten sich im Zytoplasma. Zu dieser Zeit waren in solchen Zytoplasmazonen bereits vereinzelt die Reifung von Viruskapsiden und Anzeichen erster Budding-Prozesse - Umhüllung von Nukleokapsiden an Membranstrukturen - zu erkennen (vergl. Abb. 1 und 2, Pfeile). Die Virusbildung dürfte im Bereich des Golgiapparates und im näheren endoplasmatischen Retikulum zuerst und gleichzeitig einsetzen. Umhüllungsprozesse, bei denen die gereiften Partikel in Vesikel oder Vakuolen eintreten (Abb. 3, Pfeile), konnten nur sehr selten beobachtet werden.

Hüllenlose, elektronendichte Partikel, die als Viruskapside zu deuten sind, hatten eine Größe von 30 bis 40 nm. Sie waren stets nur in geringer Zahl und nie gehäuft vorhanden. Die dominierenden und ständig zunehmenden Ansammlungen behüllter Partikel, zunächst in kleinen, Vakuolen-ähnlichen Räumen (Abb. 3), dann in größeren abgegrenzten "Virusbildungszonen" (Abb. 4 und 5) ließen erkennen, daß das Budding spontan, kontinuierlich, räumlich ungeordnet und parallel zur Entstehung der Nukleokapside mit Hilfe von Membranstrukturen stattfand, die sich unmittelbar vor dem Budding (elektronenoptisch) verdichteten (Abb. 2, Pfeile)

Mit dem Beginn der Virusbildung zeichneten sich in kernnahen "aktiven" Plasmazonen bald größere, von tubulären Strukturen sowie größeren Vesikeln umgebene und angefüllte Vakuolen ab. Im Bereich dieser Vakuolen scheint die Fertig-

Abbildung 1:Ultradünnschnitt durch eine EKN-Kulturzelle,

8 Stunden p.inf..

Erhöhte Zytoplasmaaktivität im kernnahen Bereich.Vermehrtes Auftreten vesikulärer und membranöser Strukturen,z.T.mit elektronenoptischer Verdichtung und mit ersten Anzeichen der Virusbildung (Pfeile).

N=Nukleus,ER= Endoplasmatisches Retikulum;
Vergrößerung 40.000 fach.

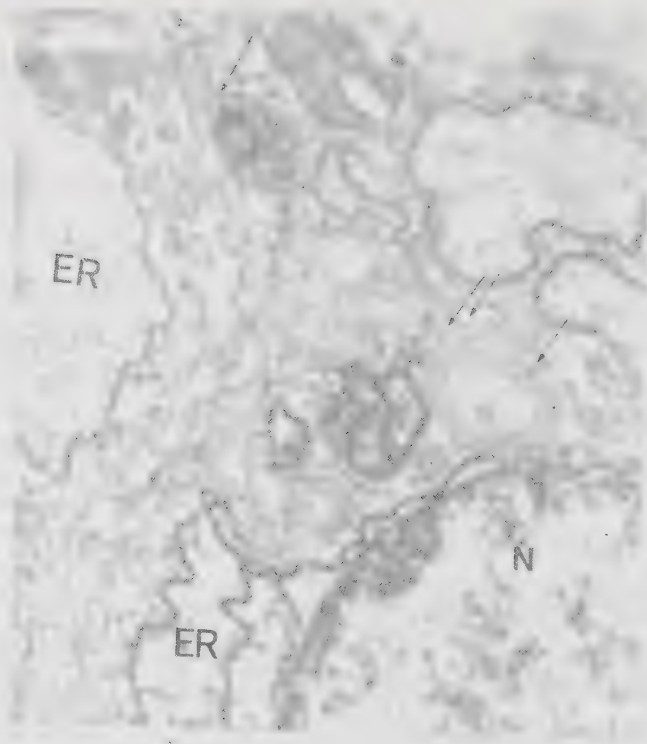


Abbildung 2: Wie Abb.1;

vermehrte Zytoplasmaaktivität mit zunehmenden Vesikeln und Membranstrukturen. Erste Anzeichen der Virusreifung an verdichteten Membranstrukturen (Pfeile).

N= Nukleus, M= Mitochondrien;

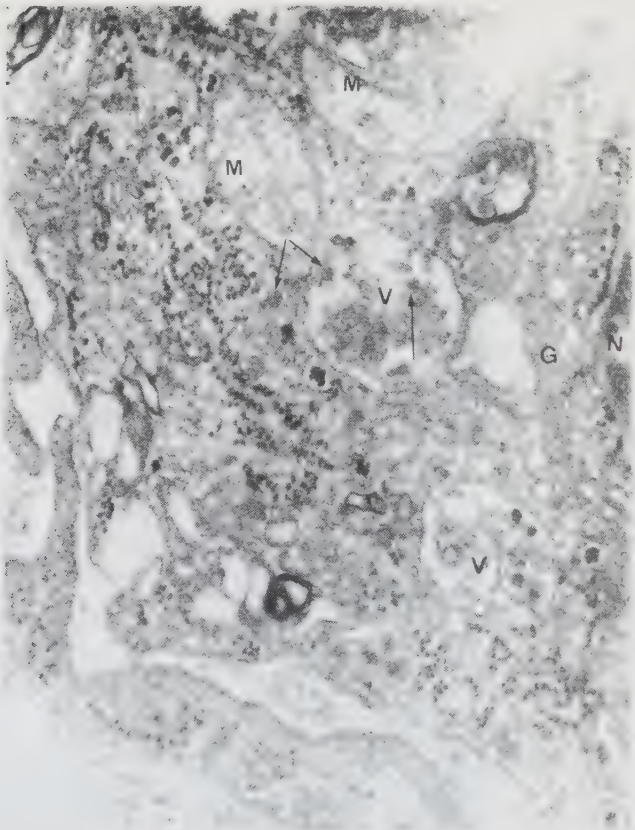
Vergrößerung 40.000 fach.



Abbildung 3: Ultradünnschnitt durch eine EKN-Kulturzelle,
19 Stunden p.inf..

Erhöhte Zytoplasmaaktivität im Golgiapparat.
Vakuolenbildung und Budding-Prozesse z.T.in
die Vakuolen (Pfeile).

M= Mitochondrien, N= Nukleus, G= Golgiapparat;
Vergrößerung 60.000 fach.



stellung von Nukleokapsiden und die unmittelbar darauffolgende Umhüllung kontinuierlich stattzufinden. Reifes Virus sammelte sich dort an (Abb. 3-5). Auffällig war dabei die Zunahme und gute Ausbildung der sicherlich vom endoplasmatischen Retikulum stammenden Membranstrukturen.

Im Zeitraum etwa zwischen der 10. und 30. Stunde nach der Zellinfektion scheint die Entwicklung dann offensichtlich in eine Phase überzugehen, in der sich echte Virusbildungszonen mit massenhafter Virusreifung ausbilden. Die Zytoplasmamatrix bestand dann vorwiegend aus Membranstrukturen. Viele dieser kreis- oder ellipsenförmig erscheinenden Strukturen waren wiederum von einer begrenzenden Membran umgeben, die als Rand einer Virusbildungszone verstanden werden kann. Die Zonen enthielten zunehmend unreife und reife Viruspartikel.

Die als Virusbildungszonen bezeichneten Zytoplasmabereiche mit sichtbarer Partikelbildung, die sicherlich mit den lichtoptisch erkennbaren Zytoplasmavakuolen identisch sind, füllten sich relativ rasch mit reifen Viruspartikeln an, während gleichlaufend die innerhalb der Grenzmembran liegenden Membranstrukturen immer mehr abnahmen. So eine Vermehrungszone (vergl. Abb. 4 und 5) enthält dann schließlich neben cytoplasmatischem Detritus überwiegend gereifte Viruspartikel. Sie sind sphärisch, also mehr oder weniger rund, besitzen einen elektronendichten Innenkörper und meistens auch eine eng anliegende Hülle. Auch abnorme Gebilde, offensichtlich Fehlprodukte der Virusvermehrung, konnten beobachtet werden.

Abbildung 4: Ultradünnschnitt durch eine EKN-Kulturzelle,
19 Stunden p.inf..

Ansammlung größerer Mengen Viruspartikel in
unregelmäßigen, aber abgegrenzten Virus-
bildungszonen im ER; reife Viruspartikel und
Anzeichen noch immer laufender Budding-
Prozesse (Pfeile).

Vergrößerung 60.000 fach.

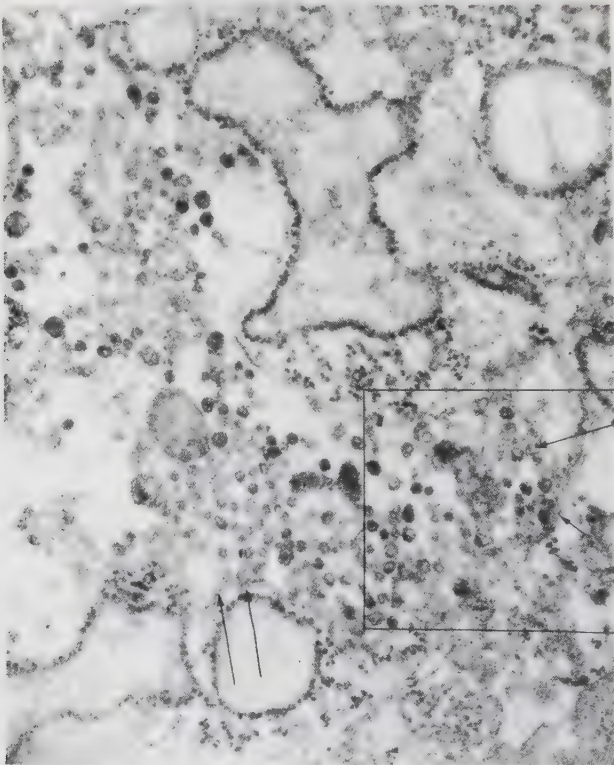


Abbildung 4a: Ausschnitt aus Abb.4.

Virushüllen liegen diffus in elektronen-
optisch dichtem Gewebe (Pfeile). Budding-
Prozesse sind damit gekoppelt.
Vergrößerung 120.000 fach.

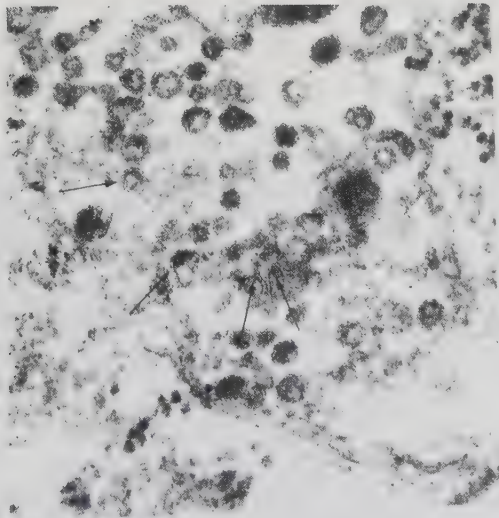


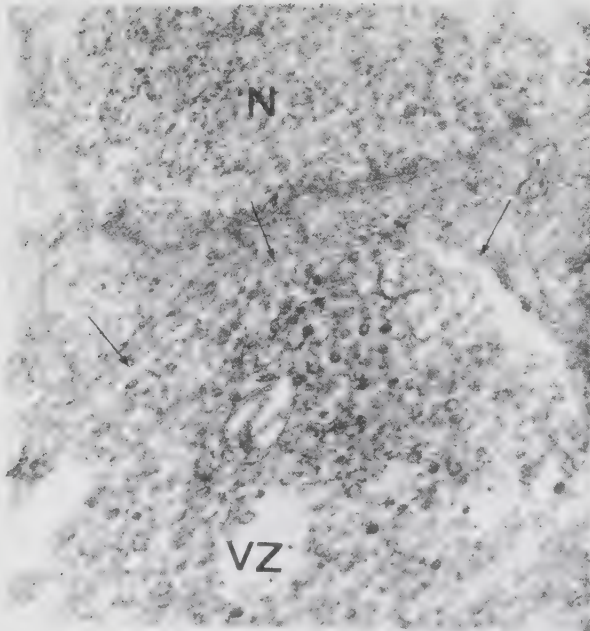
Abbildung 5:Ultradünnschnitt durch eine EKN-Kulturzelle.

34 Stunden p.inf...

Deutliche membranöse Abgrenzung (Pfeile)
einer größeren, fortentwickelten Virusbil-
dungszone (Zeitphase der lichtoptisch sicht-
baren Vakuolisierung im Zytoplasma); Virus-
partikel und vesikuläre sowie membranöse Ele-
mente.

N= Nukleus, VZ= Virusbildungszone;

Vergrößerung 60.000 fach



Die oben beschriebenen Endstadien einer intensiven Virusvermehrung in infizierten Kulturzellen wurden ausschließlich in Kulturzellen nachgewiesen, die, außer einer kleinblasigen Zytoplasma-Vakuolisierung, noch keinen lichtoptisch erkennbaren cytopathischen Effekt zeigten. In Präparaten aus cytopathisch veränderten Kulturen, also ab dem 2. Tag p. inf., ließen sich zunehmend größere Viruszonen ultrahistologisch nachweisen. Die Einzelzonen reiften und verschmolzen auch teilweise miteinander (vergl. Abb. 6). Das Zytoplasma wurde dabei mehr oder weniger zerstört, bis die infizierte Zelle praktisch überwiegend aus Viruspartikeln, Kern und Zelldetritus bestand. In diesem Stadium lysierten die Zellen. Extrazelluläres, durch die Zelllysis freigewordenes Virus (Abb. 7) war relativ häufig zu beobachten. Es lag diffus verstreut zwischen Zelldetritus und zerstörten Zellorganellen.

Die Freisetzung von reifen, umhüllten Virus über die Zelllysis bildete bei dem untersuchten Virus-Zell-System die Regel. Daneben ist jedoch nicht auszuschließen, im Gegenteil sogar wahrscheinlich, daß kleinere mit fertigen und infektionstüchtigen Virus angefüllte Vakuolen oder Viruszonen aus noch intakten Zellen über eine rein zellmechanische Abstoßung oder Ausschleusung aus der Zelle gelangen. Anhaltspunkte für solche Vorgänge wurden an den schon 8 Stunden p. inf. fixierten und geschnittenen Zellen gefunden (Abb. 8), als noch keinerlei cytopathische Veränderungen in den Zellkulturen auftraten.

Abbildung 6: wie Abb.5, jedoch 48 Stunden p.inf..

Degenerierte Zelle mit großen Viruszonen (VZ).

N= Nukleus, ER= endoplasmatisches Retikulum-Reste,

M= Zytoplasma mit Mitochondrien, Ly=Lysosomen-
ähnliche Gebilde.

Vergrößerung 30.000 fach.

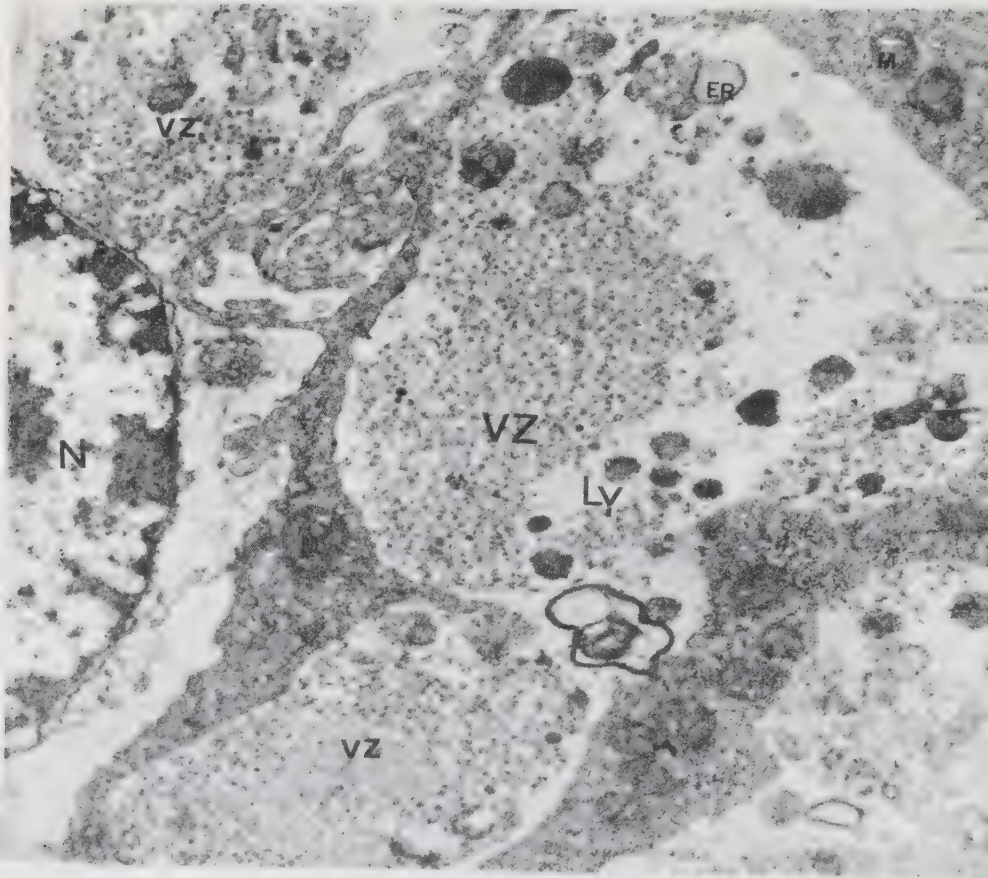
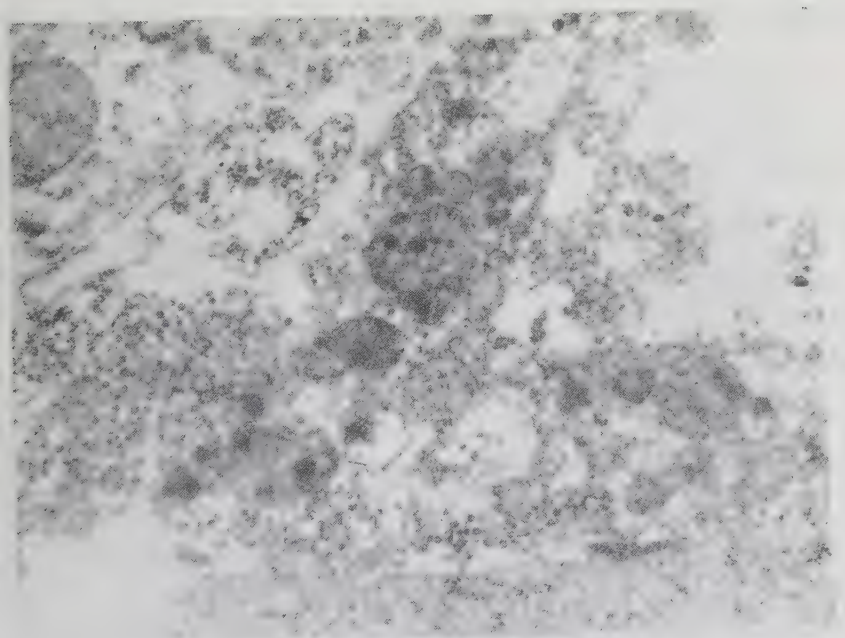


Abbildung 7: wie Abb.6.

Degenerierte, lysierende Zelle mit freigesetztem Virus, meist diffus zwischen Zellelementen.

Vergrößerung 40.000 fach.



Das ausgereifte, komplette MD-VD-Virion ist im Ultradünnschnitt rund. Es mißt etwa 45-50 nm im Durchmesser und enthält einen elektronendichten, 35-40 nm großen Innenkörper, der als Nukleokapsid angesprochen werden kann. Der Innenkörper wird von einer eng anliegenden Membran umhüllt. An gut kontrastierten Partikeln ließ sich auch manchmal eine zentrale, kleine Aufhellung im Innenkörper erkennen, eine Struktur, die auf einen kubischen Partikel-
aufbau deutet.

Die Bildung von cytopathogenem MD-VD-Virus in Kulturzellen aus embryonalen Kälbernieren dürfte demnach in den Endstadien der Virusvermehrung etwa nach folgendem Schema verlaufen:

Die Reifung der Viruspartikel setzt in bestimmten Zytoplasmazentren ein. Erst im Bereich des Golgi-Komplexes, dann aber auch fortschreitend im gesamten endoplasmatischen Retikulum entstehen mehr und mehr Nukleokapside. Sie reifen rasch und laufend durch Umhüllung (Budding) mit Hilfe von sehr zahlreich auftretenden Membranstrukturen zu fertigen Viruspartikeln. Die Zentren der Reifung gehen über in Virusbildungszonen, die dann vornehmlich membranöses Material und Partikel verschiedener Reifungsstadien, in der Endphase nur Viruspartikel und Detritus enthalten und ähnlich großen Vakuolen durch Membranen abgegrenzt werden. Die einer allmählichen Degeneration der Zelle folgenden Lysis setzt das Virus frei. Virushaltige Plasmabezirke können wahrscheinlich auch von noch intakten Zellen vor dem Eintritt cytopathischer Zellveränderungen

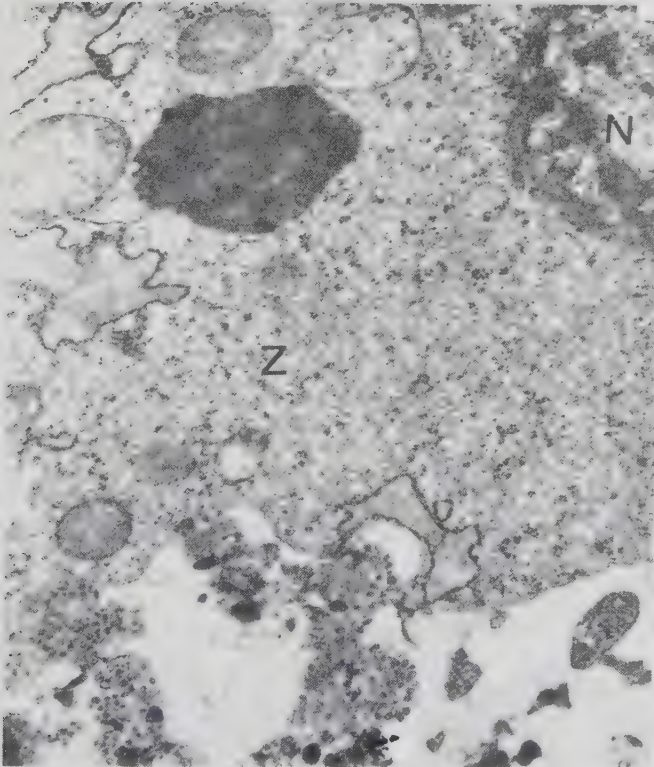
Abbildung 8: Ultradünnschnitt durch eine EKN-Kulturzelle

8 Stunden p.inf..

Vermutlicher Ausschleusungsprozess einer
virusgefüllten Vakuole aus einer noch in-
takten Zelle.

N= Nukleus, Z= Zytoplasma;

Vergrößerung 36.000 fach.



aus Zellen ausgeschleust oder abgestoßen werden.

Die ultrahistologischen Untersuchungen wurden überwiegend an Präparaten vorgenommen, welche nach herkömmlichen Verfahren aus Monolayer-Kulturen in Glasflaschen hergestellt worden waren. Die Auswertung von infizierten Kulturen, die auf Hostaphanfolien angelegt worden waren, brachte in den eigenen Versuchen keinerlei Vorteile, da mit dieser Technik pro Ultradünnschnitt, vor allem in den frühen Phasen des Virus-Zellsystems, zu wenige infizierte Zellen erfaßt werden konnten.

5. BESPRECHUNG der ERGEBNISSE

Eine ultrahistologische Studie über die Vermehrung des MD-VD-Virus in Kulturzellen muß die Erkenntnisse aus virologischen Untersuchungen an infizierten Zellkulturen berücksichtigen und kann nur das aussagen, was aus ultrahistologischen Beobachtungen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennbar ist.

Vom MD-VD-Virus war bekannt, daß sich in fluoreszenzserologisch untersuchten infizierten Kulturzellen Virusantigen schon wenige Stunden p.inf. im kernnahen und bald darauf im gesamten Zytoplasma nachweisen läßt (24). 8 Stunden p.inf. konnte erstmals neugebildetes infektiöses Virus außerhalb der Zellen im Kulturmedium erfaßt werden (29, 61). Zu diesem Zeitpunkt waren infizierte Kulturzellen nicht cytopathisch verändert. Erste Effekte ließen sich bei cytopathogenen Stämmen nach etwa 30 Stunden p.inf. als kleinblasige Vakuolisierung des Zytoplasmas an gefärbten Kulturen erkennen.

Ultrahistologisch ist die Synthese virusspezifischer Proteine (Virusvorstufen) im Zytoplasma nicht erfaßbar. Erst die Vorgänge am Ende der Virusvermehrung, die Reifung der Nukleokapside, ihre Umhüllung zum fertigen Virion und die Elution des Virus kann dargestellt werden.

Die Ergebnisse der eigenen ultrahistologischen Untersuchungen bestätigen diese Erkenntnisse. In den 8 Stunden p.inf. angefertigten Präparaten wurden erste Prozesse einer Nukleokapsidbildung und deren Umhüllung zum kompletten Partikel zuerst im kernnahen

Bereich, später über das ganze Zytoplasma verteilt, nachgewiesen. Die eigenen Beobachtungen harmonisierten ebenfalls gut mit denen bei anderen Nichtarbo-Togaviren und bei Arbo-Viren, sowohl hinsichtlich der intraplasmatischen Lokalisation der Virusvermehrung in der Endphase, als auch im zeitlichen Ablauf.

Die Entwicklung der MD-VD-Viruspartikel ging ausschließlich im Zytoplasma vor sich. Sie setzte zunächst in den kernnahen Zonen um den Golgi-Komplex ein, breitete sich dann aber rasch über weite Zytoplasmabereiche aus. Die Endphase der Virussynthese begann mit einer starken Zytoplasmaaktivität. Virusnukleokapside wurden laufend gebildet und unmittelbar darauf ausschließlich an intraplasmatischen Membranen umhüllt. Dieses Budding erfolgte offensichtlich primär an und durch Membranstrukturen, die vom Golgi-Komplex, dann aber wahrscheinlich auch vom endoplasmatischen Retikulum abhängig waren. Eine sehr ähnliche Partikelbildung ist bei HC- (69), Rubella (8, 19, 33), EA- (46) und Flaviviren (15, 25, 53, 59, 74) nachgewiesen worden. Beim Rubella-Virus (8, 19) und den Flaviviren (26, 28, 42) ging jedoch eine Ansammlung von unbehüllten Nukleokapsiden an Grenzmembranen von kleinen Vakuolen und intraplasmatischen Kanälen dem Budding voraus.

Mit der Zunahme und Ausbreitung der Partikelbildung in EKN- und KH-Zellen wurden Unterschiede zwischen den Zellreaktionen beim cytopathogenen MD-VD-Virus und anderen Togaviren deutlich. Die Reifung der MD-VD-Viruspartikel

fand später nur noch in mehr und mehr hervortretenden, großen, Vakuolen-ähnlichen Virusbildungszonen statt, die neben vielen Virionen auch zahlreiche vesikuläre und membranöse Elemente enthielten. Das nicht cytopathogene HC-Virus sammelt sich dagegen nach dem Budding in geringer Zahl in unregelmäßigen, membranbegrenzten Zonen amorpher Plasmamaterialien. Die anderen vergleichbaren Togaviren (8, 19, 26, 28, 42, 46) formieren sich als ausgereifte Partikel ebenfalls anders, nämlich überwiegend in kleinen Vakuolen oder kleinen membranbegrenzten Bezirken. Die großen Virusbildungszonen dürften morphologisch mit der kleinblasigen Vakuolisierung des Zytoplasmas identisch sein, die nur beim MD-VD-Virus als typische, cytopathische Reaktion bekannt ist.

Bei den Alphaviren wurde eine Reifung und Umhüllung der Nukleokapside an intraplasmatischen Membranstrukturen nur teilweise beobachtet (28, 31). Bei ihnen war die Endphase der Virusvermehrung überwiegend durch eine Reifung der Nukleokapside in der Nähe der Zellmembran und die darauffolgende Umhüllung durch Teile derselben im Zuge der Ausschleusung charakteristisch (2, 13, 26, 28).

Die Elution des Virion kann innerhalb der Togaviren unterschiedlich erfolgen. Bei den Alphaviren (2, 13, 26, 28) werden die Partikel überwiegend und beim Rubella-Virus (19, 54, 4) nur selten wie oben beschrieben umhüllt und gleichzeitig aus der Zelle freigesetzt. In Zusammenhang mit diesen Beobachtungen wurde nur einmal die Beteiligung von Pseudo-

podien am Ausschleusungsprozess erwähnt (31), nicht aber Mikrovilli. In allen cytopathischen Virus-Zellsystemen und bei allen Togaviren wurde neugebildetes Virus ferner durch Zytolyse aus der Zelle frei (6.19.53.61). Für das untersuchte cytopathogene MD-VD-Virus war dieser Elutionsweg der Regelfall.

Neben diesen zwei Möglichkeiten muß noch ein dritter Weg der Elution schlüssig in Betracht gezogen werden, die Abstoßung oder Ausschleusung von Vakuolen und Zytoplasma-bezirken, welche bereits umhülltes, infektiöses Virus enthalten. Nur auf diese Weise kann in noch nicht cytopathisch veränderten Zellkulturen und bei permanent infizierten Zellsystemen Virus, das nachweislich rein intraplasmatisch fertiggestellt wurde, aus der Zelle gelangen. Dieser Elutionsmechanismus wurde für das HC-Virus (69), das Rubella-Virus (61) und für die Flaviviren (15,59) angenommen. In den eigenen Untersuchungen ließen sich an nicht cytopathisch veränderten Zellen zu Beginn der Endphase Prozesse beobachten, die auch für das MD-VD-Virus diese Art der Freisetzung wahrscheinlich machen.

Ultrahistologische Untersuchungen über die Vermehrung des MD-VD-Virus und der Togaviren können auch zur Klärung der Frage beitragen, warum, bzw. wann die Vermehrung einmal mit zellzerstörendem Effekt endet, in anderen Fällen jedoch nicht bzw. in Form einer permanenten Zellinfektion weiterläuft. Anhand der eigenen Ergebnisse mit einem cytopathogenen MD-VD-Virusstamm läßt sich dazu nur feststellen, daß hier die Virusvermehrung stürmisch verlief und mit

einer gleichzeitigen Anhäufung von Virus über den Großteil des Zytoplasmas endete, wobei die Zellorganellen überwiegend eingeschmolzen wurden. Demgegenüber tritt scheinbar in mit HC-Virus infizierten, nicht cytopathisch reagierenden Kulturzellen Virus zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion immer nur in wesentlich geringeren Mengen disseminiert im Zytoplasma auf, wobei zwar begrenzt amorphe virushaltige Zytoplasmabezirke entstehen, im morphologischen Zellbild aber keine weiteren entscheidenden Veränderungen zu beobachten sind (49,69).

Direkte Vergleiche über die Zusammenhänge zwischen Virusvermehrung und Cytopathogenität werden erst möglich sein, wenn entsprechende ultrahistologische Untersuchungen mit nicht cytopathogenen MD-VD-Virusstämmen an gleichen Kulturzellen vorliegen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Vermehrung des cytopathogenen Mucosal Disease-Virus= diarrhoe-Virus, Stamm "Dänemark" UG 59, in Kulturzellen aus Kälberhoden und embryonalen Kälbernieren wurde ultra-histologisch-elektronenoptisch untersucht. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Reifung der Viruspartikel begann bei einer erhöhten Zytoplasmaaktivität im kernnahen Bereich um den Golgi-Komplex und verbreitete sich rasch über das gesamte endoplasmatische Retikulum.
2. Nukleokapside wurden kontinuierlich gebildet und an intraplasmatischen Membranen direkt anschließend in einem Budding-Prozess umhüllt. Ansammlungen unbehüllter Partikel fehlten.
3. Unbehüllte elektronendichte Nukleokapside hatten einen Durchmesser von 35-40 nm, das fertige Virion maß 45-50 nm und besaß eine etwa 5 nm starke Hülle.
4. In der Endphase der Virusvermehrung läuft die Virusreifung in größerem Ausmaß innerhalb von Virusbildungszonen ab, die zunächst neben Viruspartikeln zahlreiche vesikuläre und vakuolenähnliche Strukturen sowie Membranelemente enthalten, welche offensichtlich Bedeutung bei der Virusumhüllung besitzen. Solche Virusbildungszentren fanden sich mehr und mehr über das gesamte Zytoplasma verteilt. Sie nahmen rasch an Ausdehnung zu, grenzten sich ab und enthielten schließlich nur noch

Virus und Reste von Zellorganellen.

5. Die Elution der intraplasmatisch umhüllten Viruspartikel erfolgte durch Zellysis. Daneben schien infektionstüchtiges Virus vor dem Beginn der Zellzerstörungen auch durch Abstoßung bzw. Ausschleusung virushaltiger Vakuolen oder Zytoplasmabezirke aus der Zelle eluiert zu werden.
6. Die Endstadien der Vermehrung des MD-VD-Virus in Zellkulturen wurden mit den Mechanismen der Reifung, Umhüllung und Elution anderer Togaviren verglichen und diskutiert.

SUMMARY

Ultrahistological Studies on the Multiplication of Bovine Virus Diarrhea (BVD) Virus in Cell Cultures.

The replication of a cytopathogenic strain of bovine virus diarrhoea virus "Danmark" UG 59 in cell cultures from calf testicles and bovine embryonic kidneys was investigated by ultrahistological and electron microscopic methods. The results can be summarized as follows:

1. Maturation of virus particles began in perinuclear areas around the golgi complex and spread out rapidly to the endoplasmic reticulum. It was associated with a high activity in the cytoplasm.
2. Nucleocapsids were formed continuously and subsequently enveloped by budding. There was no accumulation of naked particles.

3. Non-enveloped electron dense nucleocapsids measured 35-40 nm in diameter, the complete virion (diameter 45-50 nm) had an envelope of 5 nm thickness.
4. During the last stages of the replication cycle the maturation of virus particles occurred on a large scale basis within virus-producing areas. In addition to the mature virus particles these areas contained numerous vesiculous and vacuole-like structures as well as membranous elements which are of importance for the envelopment of the particles. Such virus-producing areas spread more and more all over the cytoplasm. They increased in size, were clearly defined and eventually contained only virus and remnants of cytoplasmic organelles.
5. Elution of the virus enveloped intraplasmatically took place by cell lysis. In addition it seemed that virus was eluted with vacuoles or parts of cytoplasm before the beginning of cell damage.
6. The final replication phases of BVD-virus in cell cultures were discussed and compared with the mechanisms of maturation, envelopment and elution of other togaviruses.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdelwahab, K.S.E., J.D. Almeida, F.W. Doane, and D.M. Mc Lean, 1964 : Powassanvirus: morphology and cytopathology.
Canad. med. Ass. J. 90, 1068.
2. Acheson, N.H., and I. Tamm, 1964 : Replikation of Semliki Forest virus: an electron microscopic study.
Virology 32, 128.
3. Bang, F.B., G.O. Gey, M. Foard, D. Minnegan, 1957: zit. nach Mussgay, 1964.
4. Beasley, A.R., W. Lichter, and M.M. Sigel, 1961 : zit. nach Mussgay, 1964.
5. Blinzinger, K., 1972 : Comparative electron microscopic studies of several experimental group B arbovirus infections of the murine CNS (CEE virus, Zimmern virus, Yellow Fever virus).
Ann. Inst. Pasteur 123, 497.
6. Blinzinger, K., W. Müller, and A.P. Anzil, 1971 : Microhelices in the endoplasmic reticulum of murine neurons infected with a group B-arbovirus.
Arch. Virusforsch. 35, 194.
7. Blinzinger, K., G. Schaltenbrand, W. Müller, and A.P. Anzil, 1973 : Study of the virion morphology of two tick-borne group B-arboviruses (with special references to the problem of capsid symmetry).
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 124 A, 123.
8. Bonsdorff, C.H. von, and A. Vaheri, 1969 : Growth of rubella virus in BHK-21-cells and electron microscopy of morphogenesis
J. gen. Virol. 5, 47.
9. Bürki, F., 1966 : Further properties of equine arteritis virus.
Arch. Virusforsch. 19, 123.
10. Casals, J., 1966 : Special points about classification of arboviruses.
Internat. Congress for Microbiol.; Symposia held in Moscow.

11. Castrucci, G., V. Cilli, and G. Gagliardi, 1968 : Bovine virus diarrhea in Italy. I. Isolation and characterization of the virus.
Arch. Virusforsch. 24, 48.
12. Castrucci, G., G. Avellini, V. Cilli, B. Moretti, and F. Bellachioma, 1968 : Further studies on bovine viral diarrhea in Italy. Characteristics of strains isolated in Umbria and comparative studies with other strains of Italian or American origin.
Estratto dal "Boll" .Ist. Sieroter. " Milanese" 47, 7.
13. Chain, M.T., F.W. Doane, and D.M. Mc Lean, 1966 : Morphological development of Chihungunya virus.
Canad. J. Microbiol. 12, 895.
14. Chambers, V.C., 1957 : zit. nach Mussgay, 1964.
15. David-West, T.S., N.A. Labzoffsky, and J.J. Hamvas, 1972 : Morphogenesis of yellow fever virus in mouse brain.
Arch. Virusforsch. 36, 372.
16. Dinter, Z., and H.C. Borgen, 1964 : Bovine virus diarrhea (mucosal disease) virus in Swedish and Danish cattle.
Nord. Vet. Med. 16, 384.
17. Doherty, R.L., 1958 : zit. nach Mussgay, 1964.
18. Du Buy, H.G., and M.L. Johnson, 1966 : Studies on the in vivo and in vitro multiplication of the LDH-virus of mice.
J. exp. Med. 123, 985.
19. Edwards, M.R., S.M. Cohen, M. Bruno, and R. Deibel, 1969 : Micromorphological aspects of the development of rubella virus in BHK-21-cells.
J. Virol. 3, 439.
20. Erlandson, R.A., V.I. Babcock, C.M. Southam, R.B. Bailey, and F.H. Shipkey, 1967 : Semliki Forest virus in HEp-2 cell cultures.
J. Virol. 1, 996.
21. Evans, R., and M.H. Schaman, 1965 : zit. nach Du Buy, 1966.
22. Fenner, F.J., and D.O. White, 1970 : Medical Virology, S. 289; Academic Press, New York and London.

23. Fernelius, A.L., G. Lambert, and G.J. Hemness, 1969 : Bovine viral diarrhea virus-host cell interactions : adaptation and growth of virus in cell lines.
Am.J.Vet.Res. 30/2, 1591.
24. Fernelius, A.L., 1969 : Characterization of bovine viral diarrhea viruses. IV. Sequential development of BVD viral antigen in cell cultures studied by immunofluorescence.
Arch. Virusforsch. 27, 1.
25. Filshie, B.K., and J. Rehacek, 1968 : Studies of the morphology of Murray Valley encephalitis and Japanese encephalitis virus growing in cultured mosquito cells.
Virology 34, 435.
26. Gil-Fernandez, C., C. Rouda-Iain, and M. Rubio-Huertos, 1973 : Electron microscopic study of Sindbis virus morphogenesis.
Arch. Virusforsch. 40, 1.
27. Gillespie, J.H., B.E. Sheffy, and J.H. Baker, 1960 : Propagation of hog cholera virus in tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105, 679.
28. Grimley, P.M., and R.M. Friedman, 1970 : Development of Semliki Forest virus in mouse brain : an electron microscopic study.
Exp. Mol. Path. 12, 1.
29. Güneri, S., 1968 : Vergleichende serologische Untersuchungen über Beziehungen zwischen verschiedenen Mucosal Disease (Virusdiarrhoe)-Virusstämmen.
Vet., Med. Diss. München.
30. Hansen, H.J., O. Ronéus, und Z. Dinter, 1962 : Untersuchung über Mucosal Disease. II. Pathologische Anatomie der Krankheit im Vergleich mit dem cytopathogenen Effekt des Virus der Virusdiarrhoe auf die Gewebekultur.
Zbl. Vet. Med. 9, 854.
31. Higashi, N., A. Matsumoto, K. Tabata, and Y. Nagatomo, 1967 : Electron microscopic study of the development of Chihungunya virus in green monkey kidney stable (VERO) cells.
Virology 33, 55.

32. Holling, F., 1971 :
Kulturelle und serologische Untersuchungen zum Nachweis von Virusdiarrhoe-Mucosal Disease-Infektionen unter natürlichen Infektionsbedingungen.
Vet. Med. Diss. Hannover.
33. Holmes, I.H., M.C. Wark, I. Jack, and J. Grutzner, 1968 :
Identification of two possible types of virus particles in rubella-infected cells.
J. gen. Virol. 2, 37.
34. Horzinek, M., and M. Mussgay, 1969 :
Studies on the nucleocapsid structure of a group A-arbovirus.
J. Virol. 4, 514.
35. Horzinek, M., and M. Mussgay, 1971 :
Studies on the substructure of togaviruses. I. Effect of urea, desoxycholate and saponin on the Sindbis virion.
Arch. Virusforsch. 33, 296.
36. Horzinek, M., J. Maess, and R. Laufs, 1971 :
Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhea and hog cholera viruses.
Arch. Virusforsch. 33, 306.
37. Horzinek, M., 1973 :
Comparative aspects of togaviruses
J. gen. Virol. 20, 87.
38. Kaeber, G., 1931 :
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 162,
39. Kim, K.S.W., and E.S. Boatman, 1967 :
Electron microscopy of monkey kidney cell cultures infected with rubella virus.
J. Virol. 1, 205.
40. Klimenko, S.M., F.I. Yerшов, Y.P. Gofman, A.P. Nabatnikov, and V.M. Zhdanov, 1965 :
Architecture of Venezuelan equine encephalomyelitis virus.
Virology 27, 125.
41. Klister, G.S., J.M. Best, J.E. Banatvala, and G. Tonadury, 1967 :
Elektronenmikroskopische Untersuchung an Röteln-infizierten Organokulturen.
Schweiz. Med. Wschr. 97, 1377.

42. Kovac, W., Ch. Kunz, und L. Stockinger, 1961 : Die elektronenmikroskopische Darstellung des Virus der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) in HeLa-Zellen. Arch. Virusforsch. 11, 544.
43. Levkovich, E. N., and G. D. Zasukhina, 1959 : zit. nach Mussgay, 1964.
44. Maes, R., A. Vaheri, D. Sedwick, and S. Plotkin, 1966 : zit. nach Norrby, 1969.
45. Maess, J., E. Rezko, und H. O. Böhm, 1970 : Das Pferdearteritisvirus (equine-arteritis virus): Seine Vermehrung in BHK-21-Zellen, die Bestimmung der Flotationsdichte und die elektronenoptische Darstellung. Arch. Virusforsch. 30, 47.
46. Magnusson, P., B. Hyllseth, and H. Marusyk, 1970 : Morphological studies on equine arteritis virus. Arch. Virusforsch. 30, 105.
47. Malmquist, W. A., A. L. Fernelius, and D. E. Gutekunst, 1965 : Interference of bovine viral diarrhea virus by hog cholera virus in swine kidney cell cultures. Am. J. Vet. Res. 26, 1316.
48. Mahnel, H., 1968 : zit. nach Mahnel und Mayr, 1974.
49. Mahnel, H., and A. Mayr, (im Druck) : Die Schweinepest. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
50. Mayr, A., P. A. Bachmann, B. E. Sheffy, and G. Siegl, 1968 : Morphological characteristics of swine fever virus. Vet. Rec. 82, 745.
51. Mc Collum, W. H., E. R. Doll, J. C. Wilson, and C. B. Johnson, 1961 : Propagation of equine arteritis virus in monolayer cultures of equine kidney. Am. J. Vet. Res. 22, 731.
52. Melnick, J. L., 1973 : Classification of animal viruses. Progr. Med. Virol., Vol. 15, Seite 380.
53. Murphy, F. A., A. K. Harrison, G. W. Garry, S. G. Whitfield, and F. T. Forrester, 1968 : St. Louis encephalitis virus infection of mice. Electron microscopic studies of central nervous system. Lab. Invest. 19, 652.

54. Murphy, F.A., Halonen, and A.K. Harrison, 1968 : Electron microscopy of the development of rubella virus in BHK-21-cells.
J. Virol. 2, 1223.
55. Murphy, F.A., S.G. Whitfield, P.C. Coleman, E.R. Rabin, A.B. Jensen, J.L. Melnick, M.R. Edwards, and E. Whitney, 1968 : California group arboviruses: electron microscopic studies.
Exp. Mol. Path. 2, 44.
56. Mussgay, M., 1964 : Growth of arboviruses in vertebrate and arthropod cells.
Progr. Med. Virol. 6, 193.
57. Norrby, E., 1969 : Rubella Virus.
Virology Monographs, Vol. 7
Springer Verlag.
58. Oker-Blom, N., 1956 : zit. nach Mussgay, 1964.
59. Ota, Z., 1965 : Electron microscope study of the development of Japanese B encephalitis virus in porcine kidney stable (PS) cells.
Virology 25, 372.
60. Oyangi, S., F. Ikuta, and E.R. Ross, 1969 : Electron microscopic observations in mice infected with Japanese B encephalitis virus.
Acta Neuropath. 13, 169.
61. Parks, J.B., R.F. Pri-chelt, and Y.C. Zee, 1972 : Buoyant density of bovine viral diarrhea virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 595.
62. Peter, C.P., J.R. Duncan, D.E. Tyler, and F.K. Ramsey, 1968 : Cytopathologic changes of lymphatic tissue of cattle with the bovine virus diarrhea-mucosal disease complex.
Am. J. Vet. Res. 29/1, 939.
63. Plagemann, P.G.W., and H.E. Swim, 1963 : zit. nach Du Buy, 1966.
64. Prosser, P.R., and R. Evans, 1967 : An electron microscopic study of lactic dehydrogenase virus in cultures of mouse peritoneal macrophages.
J. gen. Virol. 1, 419.

65. Reynolds,E.S., 1963 : The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17, 208.
66. Ritchie,A.E.,and A.L. Fernelius, 1969 : Characterization of bovine viral diarrhea viruses. V. Morphology of characteristic particles studied by electron microscopy. Arch. Virusforsch. 28, 369.
67. Simpson,R.W.,and R.E. Hauser, 1968 : Basic structure of group A arbovirus strains Middleburg,Sindbis and Semliki Forest examined by negative staining. Virology 34, 358.
68. Simpson,R.W.,and R.E. Hauser, 1968 : Structural differentiation of group A arboviruses based on nucleoid morphology in ultrathin sections. Virology 34, 568.
69. Scherrer,R.,J.M.Ayraud, J.Cohen,et E.Bic, 1970 : Etude au microscope electronique durire de la peste porcine classique dans des coupes ultrafines de cellules infectees in vitro. C.R.Acad.Sc.,Paris 271, 620.
70. Schulze,B., 1966 : Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis des Schweinepestvirus in Endothelzellen. Arch. exp. Vet. Med. 20, 1349.
71. Vaheri,A.,W.D.Sedwick, S.A.Plotkin,and R. Maes, 1967 : zit. nach Norrby, 1969.
72. Wizigmann,G.,und E. Weiss, 1967 : Über das Auftreten der Mucosal-Disease (Virusdiarrhoe bei Rindern) in Bayern. Tierärztl.Umschau 22, 153.
73. Yaffe,D.,1962 : zit. nach Du Buy, 1966.
74. Yasuzumig,G.,and J. Tsubo, 1965 : Analysis of the development of Japanese B encephalitis (JBE) virus. II. Electron microscopic studies of neurons infected with JBE-Virus. J.Ultrastruct. Res. 12, 304.

Herrn Prof.Dr.H.Mahnel möchte ich an dieser Stelle
für die Überlassung des Themas und für wertvolle
Hinweise und seine hilfreiche Unterstützung danken.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes gilt
Herrn Prof.Dr.Dr.h.c .A.Mayr mein besonderer Dank.

8. LEBENS LAUF

Am 5.2.1948 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. Albert Niess und seiner Ehefrau Gisela, geb. Braune-Krickau, in München geboren, wo ich 1954 in die Volksschule eintrat. Ab 1958 besuchte ich die Oberrealschule.

Nach dem Umzug unserer Familie nach Isny im Allgäu, war ich bis zum Abitur Schülerin des Gymnasiums in Wangen.

Im Wintersemester 1966/67 immatrikulierte ich mich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität in München, studierte im Wintersemester 1969/70 in Wien und beendete mein Studium im Oktober 1971 in München.

Seit Dezember 1971 beschäftige ich mich mit meiner Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

